

遺伝子増幅検出装置 RD-200 の臨床的有用性の評価

辻本 正彦

大阪警察病院 病理診断科：大阪市天王寺区北山町10-31（〒543-0035）

OSNA法は現在、主に乳癌におけるセンチネルリンパ節転移の術中迅速検査に利用されている。当院ではOSNA法が保険収載された2008年11月から現在までOSNA法によるリンパ節転移検査を行ってきた。今回、新たにOSNA法の次世代機種として遺伝子増幅検出装置RD-200（シスメックス株式会社；以下、RD-200）が発売されたため、その臨床性能の評価を実施した。方法としては、同一サンプルを遺伝子増幅検出装置RD-100i（シスメックス；以下、RD-100i）とRD-200で測定し、検体受取から結果報告までのTAT（Turn Around Time）および判定結果の比較を行った。また同時に実施している捺印細胞診とRD-200の判定結果の比較も行った。結果、RD-100iとRD-200は98.1%、捺印細胞診とRD-200は92.5%と高い判定一致率が得られた。さらにTATにおいては、RD-100iと比較してRD-200ではリンパ節の個数に応じて約7分～13分短縮する結果となった。本検討により、RD-200はRD-100iと遜色ない臨床性能を有することが確認され、安全に移行できることが示唆された。またユーザビリティにおいてもRD-200ではRD-100iが有していたいくつかの課題点が大幅に改善されており、検査現場の業務効率化にも寄与すると考えられる。今後、RD-200が医療現場において利益をもたらすことを期待している。

キーワード

OSNA法, RD-200, リノアンプCK19, CK19

はじめに

2018年7月OSNA（One-Step Nucleic Acid Amplification）法専用の遺伝子増幅検出装置RD-100i（シスメックス株式会社；以下、RD-100i）の次世代機種として新たに遺伝子増幅検出装置RD-200（シスメックス；以下、RD-200）が発売され、専用試薬としてサイトケラチン19 mRNA キット リノアンプCK19（シスメックス；以下、リノアンプCK19）が発売された。

当院ではOSNA法が保険収載された2008年11月より現在まで、乳癌手術症例1,100余症例において乳癌センチネルリンパ節生検の術中迅速診断にRD-100iを活用している。RD-100iではリンパ節転移の客観的な半定量的評価が得られるため、その結果に基づき医師が適正な術中の追加リンパ節郭清

の適応判断を行っている。また、OSNA法でのセンチネルリンパ節転移陰性症例は従来の病理組織学的方法によるリンパ節転移陰性症例より、予後が良好であることが報告されており¹⁾、治療方法の選択においても有用な情報を提供している。一方で、RD-100iには1) 1バッチで4検体しか測定できない、2) 測定時間がやや長い、3) 反応阻害という現象が有り、それを回避するために測定サンプルとともに希釈サンプル検体を同時に測定しなければいけない、4) 外部PCによる画面操作、5) 試薬開封後の有効期限が短い、6) 試薬管理がやや煩雑、などの課題点があった。それらの課題点を改善したRD-200とRD-100iを比較し、RD-200の臨床的有用性を評価した。

当院におけるセンチネルリンパ節生検の流れ

当院における検体受取から結果判定までの流れは図1のとおりである。検体を受け取った後、各リンパ節を2mm間隔で複数切片に分割し、そのすべてをスライドに捺印した後、リンパ節全体をOSNA法に供しており、またOSNA法と同時並行で捺印細胞診を実施している。なお、即時結果が得られる捺印細胞診においてスライド中に300個以上のがん細胞が確認された場合は、その結果を手術室に報告し、腋窩リンパ節郭清が実施される。一方スライド中のがん細胞が300個未満、もしくはがん細胞が確認されなかった場合は、OSNA法の判定結果を待つて手術室に報告する流れとなっている。

対象およびサンプル調製方法

・対象検体：

乳癌の手術で摘出された乳癌所属リンパ節

・サンプル調製方法：

採取したリンパ節はリノアグで破碎後、RD-100i用のサンプルとして「測定サンプル」および「希釈サンプル」を調製した。また同一のリンパ節可溶化液から、RD-200用のサンプルとして、リン

パ節可溶化液の10倍希釈液である「測定サンプル」のみを調製した。

RD-100iでは「測定サンプル」とその10倍希釈である「希釈サンプル」を調製し、2つのサンプルをRD-100iで測定する仕様であったが、RD-200では試薬改良により検体由来の遺伝子増幅阻害の影響を受けにくくなり「希釈サンプル」の測定が不要となった。そのため「測定サンプル」のみを測定する手順となっており、操作が簡便化している(図2)。

評価方法

1. 評価内容1：TAT (Turn Around Time) の比較

同一リンパ節から調製したリンパ節可溶化液をRD-100iとRD-200の両方で測定に供し、TATの比較を行った。検体受取から結果報告までを各ステップに分割し、それぞれの所要時間を測定した(表1)。

なお、RD-200では同時に測定できるリンパ節数が14個に増加したが、今回は2装置の比較を行うためRD-100iで測定可能なリンパ節数(1個～4個)を対象とした。またリンパ節の個数によって所要時間が変わるため、それぞれのリンパ節数における所要時間を測定した。

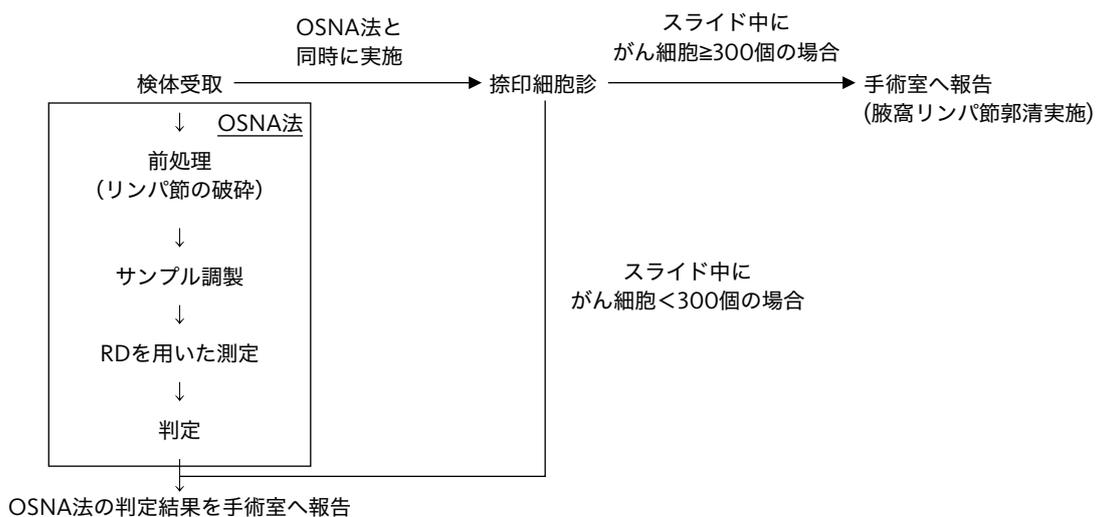


図1. 検体受取から結果判定までの流れ

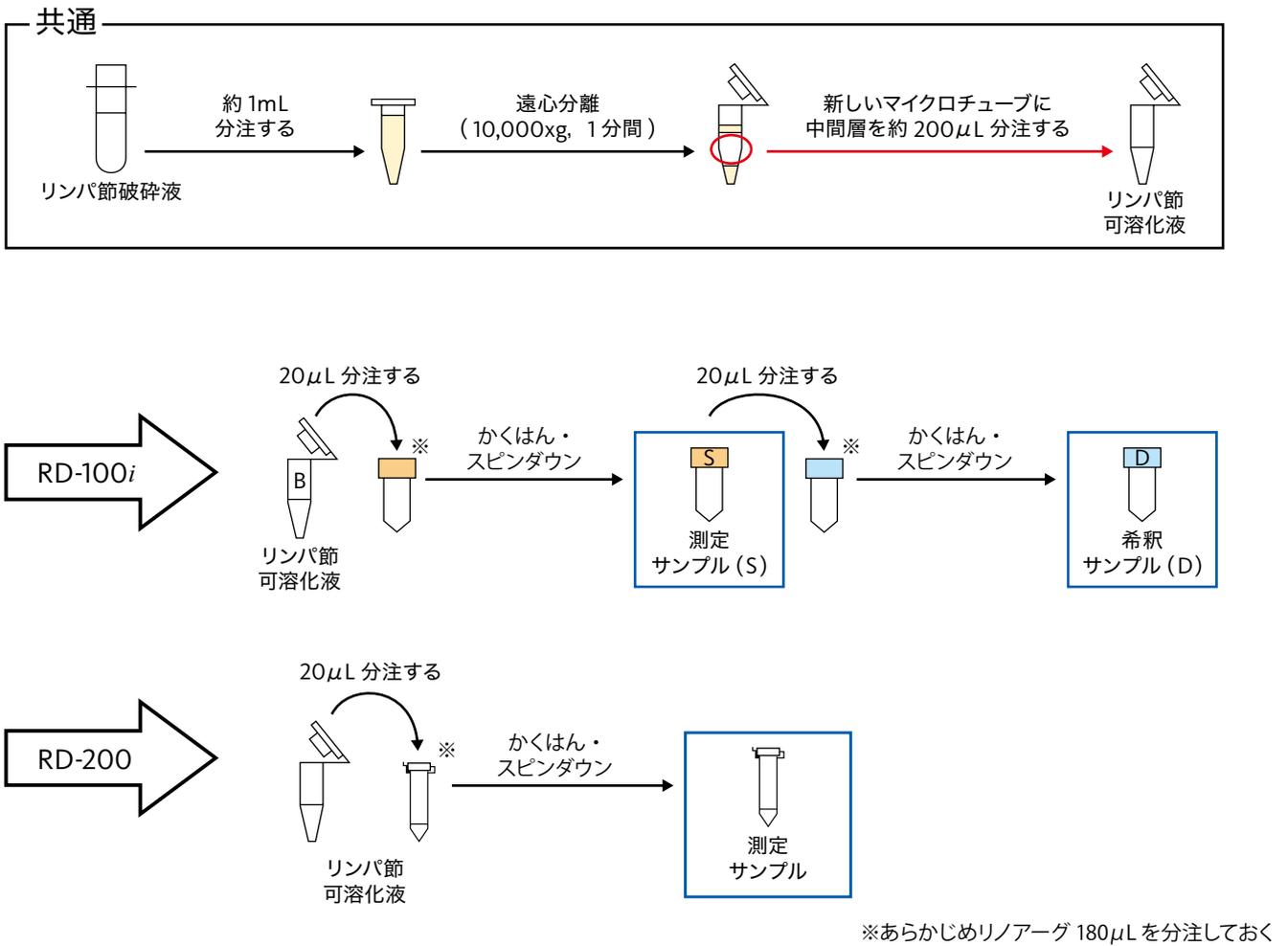


図2. サンプル調製手順

表1. TAT 測定における各ステップ

	含まれる作業
STEP 1 リンパ節の受取	<ul style="list-style-type: none"> ・センチネルリンパ節受取 ・トリミング, 重量測定, 分割 (引き続き別担当者が捺印細胞診を実施) (システムへ検体情報の登録) ・リンパ節をリノアグへ投入
STEP 2 OSNA 法: リンパ節の破碎	<ul style="list-style-type: none"> ・リンパ節の破碎 (1分間) ・1分間の遠心分離 ・中間層を分注し, リンパ節可溶化液を調製
STEP 3 OSNA 法: サンプル調製	<ul style="list-style-type: none"> ・サンプル調製 ・試薬の準備 (ボルテックス, スピンドウン) ・装置への試薬, サンプル設置
STEP 4 OSNA 法: 測定	RD-100i/RD-200 による測定
STEP 5 結果報告	結果報告 (技師によるダブルチェック, 病理医の確認後インターフォンで報告)

2. 評価内容2：RD-100i との一致率

RD-100i と RD-200 の判定一致率を評価した。
それぞれの装置における判定基準は（表2，表3）
のとおりである。

3. 評価内容3：捺印細胞診との一致率

捺印細胞診と RD-200 の一致率を評価した。
捺印細胞診の判定基準は（表4）のとおりである。

結果

1. 評価内容1：TAT の比較

各ステップの所要時間を，下表に示す（表5）。
RD-100i と RD-200 で同様の作業が発生する部分（STEP 1, 2, 5）に関しては，RD-100i 測定時の
所要時間と同等と仮定して合計時間を算出した。
結果，検体受取から結果報告までの時間は，RD-100i
では約 35 分（リンパ節 1 個）～約 1 時間 6 分（リンパ

表2. RD-100i の判定方法

		希釈サンプルの CK19 mRNA*1 コピー数 (copies/ μ L)		
		カットオフ値未満 (<250)	カットオフ値以上 (≥ 250)	
		<250	≥ 250 $<5,000$	$\geq 5,000$
測定サンプルの CK19 mRNA コピー数 (copies/ μ L)	カットオフ値以上 (≥ 250)	$\geq 5,000$	陽性 (++)	
	カットオフ値未満 (<250)	≥ 250 , $<5,000$	陽性 (+)	陽性 (+) I*2
		<250	陰性 (-)	陽性 (+) I*2

*1：サイトケラチン 19 (CK19) mRNA

*2：測定サンプルによってはリンパ節に含まれる物質により遺伝子増幅反応が阻害されることがある。測定サンプルのコピー数が 250 copies/ μ L 未満にも関わらず希釈サンプルのコピー数が 250 copies/ μ L 以上だった場合、もしくは測定サンプルのコピー数が 250 copies/ μ L 以上 $5,000$ copies/ μ L 未満にも関わらず希釈サンプルのコピー数が $5,000$ copies/ μ L 以上となる場合には、増幅反応阻害検体（増幅反応の阻害を受けたサンプル）として扱い、RD-100i での判定結果には (+)I と表示され陽性と判定される。

表3. RD-200 の判定方法

測定サンプルの CK19 mRNA コピー数 (copies/ μ L)	カットオフ値以上	$\geq 14,000$	陽性 (++)
	(≥ 900)	≥ 900 , $<14,000$	陽性 (+)
	カットオフ値未満 (<900)	<900	陰性 (-)

表4. 捺印細胞診の判定方法

スライド中のがん細胞の数 (個)	判定	対応
$300 \leq$	++	捺印細胞診の結果を手術室に報告する。
≥ 1 , <300	+	OSNA 法の結果を待ち、手術室に報告する。
0	-	

節 4 個) 要していたのに対し、RD-200 では約 28 分～約 54 分であった。
RD-200 では、主に希釈サンプル調製の省略による

手技の時間短縮と、測定の世界短縮により RD-100i と比較して約 7 分～ 13 分短縮する結果となった (図 3)。

表 5. 各ステップの所要時間の比較

リンパ節数		1 リンパ節		2 リンパ節		3 リンパ節		4 リンパ節	
装置		RD-100i	RD-200	RD-100i	RD-200	RD-100i	RD-200	RD-100i	RD-200
STEP 1	リンパ節の受取	3:12	—	3:15	—	3:09	—	12:55	—
STEP 2	OSNA 法：リンパ節の破碎	4:53	—	7:15	—	10:17	—	15:03	—
STEP 3	OSNA 法：サンプル調製	3:50	2:27	4:04	2:26	4:44	3:52	7:34	4:00
STEP 4	OSNA 法：測定	22:22	16:59	24:27	17:09	26:49	19:02	29:02	19:39
STEP 5	結果報告	0:42	—	2:09	—	3:29	—	1:59	—
所要時間	Total (STEP 1～5)	35:02	28:13	41:07	32:14	48:28	39:49	1:06:34	53:36
	OSNA 関連 (STEP 2～4)	31:05	24:19	35:46	26:50	41:50	33:11	51:39	38:42
装置間差 RD-100i - RD-200	Total (STEP 1～5)	6:49		8:53		8:39		12:58	
	OSNA 関連 (STEP 2～4)	6:46		8:56		8:39		12:57	

TAT の比較 (リンパ節をリノアグへ投入～結果判定)

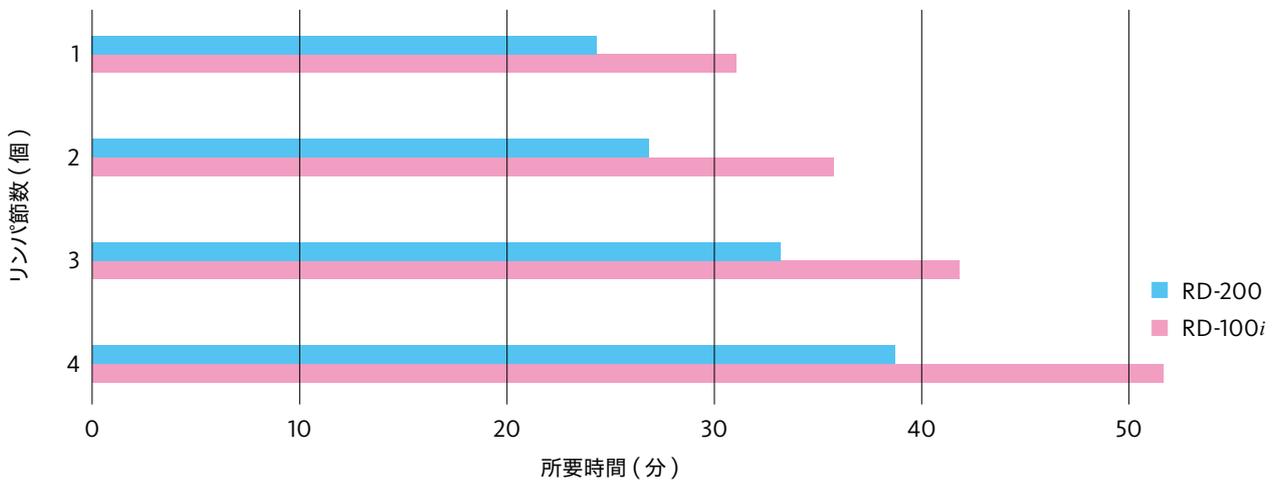


図 3. OSNA 関連操作における所要時間の比較

2. 評価内容2：RD-100i との一致率

リンパ節ベースの陽性／陰性の判定一致率は98.1%と良好な結果であった。これにより、RD-200はRD-100iに遜色ないデータが得られることが明らかとなった。評価期間中、(+) I 判定の検体は認められなかった(表6)。

3. 捺印細胞診との一致率

捺印細胞診との陽性／陰性の判定一致率は92.5%であった(表7)。

考 察

今回の検討により、RD-200ではRD-100iと同等の臨床性能を有しており、さらにTATは大幅に短縮することが分かった。これによりRD-200へ切り替えることも問題はないと考えられた。リンパ節4個の場合でも検体受取から結果報告まで1時間以内で報告が可能であり、これは術中迅速診断のための検査として臨床に大きく貢献できる点と考えられる。

RD-100iとRD-200では高い一致率が得られた一方、判定不一致となったリンパ節が2リンパ節あった(表8)。OSNA法はリンパ節転移の陽性陰性を判定する定性検査のため、今回は定性判定結果が乖離した検体2において詳細に検証した。

表6. RD-200とRD-100iの判定結果

53リンパ節 (20症例)			RD-200		
			陽性		陰性
			(++)	(+)	(-)
RD-100i	陽性	(++)	3	0	0
		(+)	1	1	1
	陰性	(+) I	0	0	0
		(-)	0	0	47

$(3+1+1+47)/53 \times 100 = 98.1\%$

表7. RD-200と捺印細胞診の判定結果

53リンパ節 (20症例)			RD-200		
			陽性		陰性
			(++)	(+)	(-)
捺印細胞診	陽性	(++)	1	0	0
		(+)	1	0	1
	陰性	(-)	2	1	47

$(1+1+47)/53 \times 100 = 92.5\%$

表8. RD-100iとRD-200の判定不一致検体 初回測定結果

	RD-100i		RD-200		(参考) 捺印細胞診
	判定	CK19 mRNA 測定値 [copies/ μ L]	判定	CK19 mRNA 測定値 [cCP/ μ L]*	
検体1	(+)	4,100	(++)	9,400 (24,000 copies/ μ L)	-
検体2	(+)	628	(-)	<60 (<250 copies/ μ L)	-

*RD-200専用試薬であるリノアンプCK19は、RD-100iの専用試薬リノアンプBCから試薬組成を見直したため、遺伝子増幅効率が変わり、同一リンパ節から調製した検体を測定した場合、リノアンプCK19ではリノアンプBC(シスメックス)と比較して高値傾向になる。そのため、RD-200ではコピー数をRD-100i相当に変換した単位cCP/ μ Lが並列して表示される仕様となっている。今回は両装置の比較を容易にするため、RD-200のコピー数はcCP/ μ Lの数値を用いた。

検体 2 の追加検証のため、-80℃で凍結保存したリンパ節可溶化液を用いて再度「測定サンプル」「希釈サンプル」を調製し、RD-100i、RD-200 で 3 回ずつ再測定を実施した。結果を(表 9)に示す。

測定の結果、RD-200 ではすべて (-) であり初回測定と一致する結果となった。一方 RD-100i においては、再測定結果にバラツキが確認された。3 測定ともに比較的 low コピー数であり、測定の実現性が結果判定の乖離に影響した可能性が考えられた。またこの検体は初回測定時、リンパ節をホモジナイズした後のリンパ節破碎液の状態において、通常のリンパ節と比較して非常に粘性が高いことが確認されている。このことより、検体の粘性が高いために溶液中が均一になっておらず、吸引した検体中の CK19 mRNA 量が一定ではなかった可能性も考えられた。(+) I 判定も 1 度認められていることから、検体由来の物質が非常に強い遺伝子増幅阻害作用を持ち、判定結果に影響を及ぼした可能性が考えられた。

次に、RD-200 と捺印細胞診の不一致 4 検体について考察する。

以下にそれぞれの検体の RD-100i の判定結果も合わせて(表 10)に示す。

検体 1, 2, 3 は RD-200 で陽性、捺印細胞診で陰性となった。OSNA 法はリンパ節全体を破碎してがん細胞中の CK19 mRNA を検出するのに対し、捺印細胞診は断面のみの部分的な観察となるため、癌細胞の局在化により結果に乖離が生じたものと推察される。

一方、検体 4 は RD-200 で陰性、捺印細胞診では標本上 21 個の異型細胞が認められ、捺印細胞診陽性となった。当院における捺印細胞診の判断基準では、1 個以上のがん細胞があれば + と判定し OSNA 法の結果を採用する運用となっており、ITC もこの + に含まれる。また RD-200 も陰性判定ではあるが、測定時間内に CK19 mRNA の増幅を検出しており、陰性レベルのわずかながん細胞が転移している可能性が考えられた。

表 9. RD-100i と RD-200 の判定不一致検体 再測定結果

	RD-100i		RD-200		
	判定	測定サンプル CK19 mRNA 測定値 [copies/μL]	判定	測定サンプル CK19 mRNA 測定値 [cCP/μL]	
検体 2	初回	(+)	628	(-)	<60
	再測定	(-)	<250	(-)	<60
		(+)	1,086	(-)	<60
		(+)I	<250	(-)	<60

表 10. RD-200 と捺印細胞診の判定不一致検体

	RD-200	捺印細胞診	(参考) RD-100i
検体 1	陽性 (++)	-	陽性 (+)
検体 2	陽性 (+)	-	陽性 (+)
検体 3	陽性 (++)	-	陽性 (++)
検体 4	陰性 (-)	+	陰性 (-)

RD-200 を使用してみて：病理技師の立場から

測定操作に関しては、RD-100i から改良されたポイントがいくつかあった。

まず現場として最も大きなメリットと感じたのは、希釈検体の測定がなくなったことである。サンプル調製時の作業が従来の 2 段階から 1 段階になったことは現場にとって大きな負担軽減になると感じた。また測定前準備であるリノアグの分注も半分になるため OSNA 検査に関する作業時間全体の短縮にも繋がっている。試薬の管理に関しては、RD-100i では手入力でのロット番号入力や、使用テスト数から試薬の残量管理、凍結融解回数の管理を担当者自身が管理用紙や試薬のキャップに記載して管理していた。これが RD-200 ではバーコードの読み取りによってすべて自動管理が可能となったため、手作業で実施していた細かい作業がすべて不要となり、業務効率化に繋がると感じている。試薬の開封後有効期限も 1 か月から 2 か月に延長されており、OSNA の測定数が少ない場合でも試薬のロスを減らすことができるのではないかと考えられる。また操作は装置に内蔵されたタッチパネルで行い、付属のパソコンが不要になったため、設置面積が狭くなり、検査室内の限られたスペースを有効に活用できるようになっている。

結 論

今回、新しく発売された RD-200 の臨床性能の評価を実施した。

その結果、データ面では RD-100i と遜色のない臨床性能が確認され、安全に RD-200 への移行が行えるものと思われる。また同時に測定できるリンパ節数の増加、TAT の短縮やユーザビリティの向上により、RD-200 においては RD-100i が有していたいくつかの欠点が大幅に改善されていた。検査現場の業務効率化にも寄与すると考えられる。

現在、OSNA 法は乳癌に加えて大腸癌、胃癌、肺癌へも適応が拡大されており（肺癌は RD-100i/ リノアンプ BC のみ適用、2019 年 10 月現在）、今後これらの癌腫における臨床現場での応用が広がる際にも、RD-200 は十分にその機能を発揮するものと期待される。RD-200 がこれらの癌患者様における的確な診断、適切な治療方針の選択に利益をもたらすことを期待している。

遺伝子増幅検出装置 RD-100i：医療機器製造販売届出番号
28B1X10014000032

遺伝子増幅検出装置 RD-200：医療機器製造販売届出番号
28B1X10014000040

リノアンプ BC：体外診断用医薬品製造販売承認番号
22000AMX01627000

リノアンプ CK19：体外診断用医薬品製造販売承認番号
23000EZX00019000

※「OSNA」「リノアンプ」はシスメックス株式会社の商標または登録商標です。

参考文献

- 1) Shimazu K, Miyake T, Okuno J et al. One-step Nucleic Acid Amplification Can Identify Sentinel Node-negative Breast Cancer Patients With Excellent Prognosis. Anticancer Res. 2019 Mar ; **39** (3): 1447-1454

Evaluation of Clinical Performance of the Automated Gene Amplification Detector RD-200

Masahiko TSUJIMOTO

Department of Pathology, Osaka Police Hospital, 10-31 Kitayamacho, Tennoji-ku, Osaka 543-0035

The OSNA method is currently used for intraoperative diagnosis of sentinel lymph node metastasis mainly in breast cancer. Our hospital has been conducting lymph node metastasis examination by OSNA method since November 2008, when it was covered by insurance. With a new release of the OSNA method next generation model, the Gene Amplification Detector RD-200 (hereinafter referred to as RD-200), its clinical performance was evaluated. As a method, same samples were measured with Gene Amplification Detector RD-100i (hereinafter referred to as RD-100i) and RD-200, which were evaluated in TAT (Turn Around Time - from the receipt of the specimen to the result report) and judgement results.

We also compared the results of RD-200 and stamp cytology. As a result, a high concordance rate of 98.1% was obtained with RD-100i and RD-200, and 92.5% with stamp cytology and RD-200. Furthermore, TAT was shortened by about 7 to 13 minutes depending on the number of lymph nodes in RD-200 compared to RD-100i. This study confirmed that RD-200 has clinical performance comparable to RD-100i, suggesting that it can be safely replaced. In terms of usability, RD-200 has significantly improved some of the issues that RD-100i had, and it is thought that it will contribute to operational efficiency at inspection sites. In the future, we expect RD-200 to bring benefits in the medical field.

Key Words

OSNA, RD-200, LYNOAMP CK19, CK19
